

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

LB medium (Luria-Bertau medium) (Ronald, 1993)

Bactotryptone	1 %
Yeast extract	0.5%
NaCl	0.5%
Agar	2 %

ปรับน้ำกลั่นให้ได้ตามปริมาณที่ต้องการ

2. การเตรียม ampicillin ความเข้มข้นสูง เพื่อใช้เตรียมอาหารทดสอบเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด (transformants)

ampicillin	100 mg
น้ำกลั่น	1 ml

เมื่อเตรียมอาหาร LB เสร็จแล้วให้เติมสารละลาย ampicillin 100 mg/ml ในปริมาณ X μ l ต่อปริมาณอาหาร LB X ml สุดท้ายจะได้ความเข้มข้น ampicillin 100 μ g/ml ในอาหาร LB ดังสมการที่ 1

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายตั้งต้น

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาณของสารละลายตั้งต้น

V_2 = ปริมาณของสารละลายที่ต้องการ

$$N_1 V_1 = N_2 V_2 \text{ ----- (1)}$$

$$(100 \text{ mg/ml}) (X) = (100 \text{ } \mu\text{g/ml}) (100 \text{ ml})$$

$$(100,000 \text{ } \mu\text{g/ml}) (X) = (10,000 \text{ } \mu\text{g})$$

$$X = \frac{(10,000 \text{ } \mu\text{g})}{(100,000 \text{ } \mu\text{g/ml})}$$

$$X = 0.1 \text{ ml}$$

$$= 100 \text{ } \mu\text{l}$$

$$* \text{ ดังนั้น } V_1 (\mu\text{l}) = V_2 (\text{ml})$$

3. การเตรียมบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

3.1 0.5 M EDTA

dissodium ethylenediamine tetraacetate . 2H ₂ O (EDTA)	136.1 g
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ	1,000 ml

หมายเหตุ ผสม EDTA ที่ชั่งได้ทั้งหมดกับน้ำกลั่นปริมาณ 800 ml ก่อนปรับ pH = 8.0 ด้วย NaOH ผสมให้เข้ากัน ซึ่งจะพบว่าสาร EDTA จะละลายกลายเป็นเนื้อเดียวกับน้ำกลั่นเมื่อ pH = 8.0 สุดท้ายทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ml ทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (sterile) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

3.2 Loading buffer

bromophenol blue	0.25 %
xylene cyanol	0.25 %
สารละลาย Sucrose	40 %

หมายเหตุ หลังจากผสมสารทั้งหมดจนเป็นเนื้อเดียวกัน นึ่งฆ่าเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

3.2 Ethidium bromide (10 mg/ml)

ethidium bromide	1 g
น้ำกลั่น	100 ml

หมายเหตุ คนจนเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °C

ข้อควรระวัง เนื่องจาก ethidium bromide เป็นสารที่มีคุณสมบัติ strong mutagen อันเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อร่างกายได้ จึงควรระมัดระวังการซังสารและเตรียมสารอย่างมาก ด้วยการสวมถุงมือและปิดจมูก

3.3 TAE buffer 50 X

Tris base	242 g
glacial acetic acid	57.1 ml
0.5 EDTA pH 8.0	100 ml

หมายเหตุ ผสมสารทั้งสามชนิดจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วย น้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้าย 1,000 ml จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง

3.4 TE buffer

Tris HCl pH 8.0 10 mM

EDTA pH 8.0 1 mM

หมายเหตุ ผสมสารทั้งสองให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงฆ่าเชื้อเก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 °C

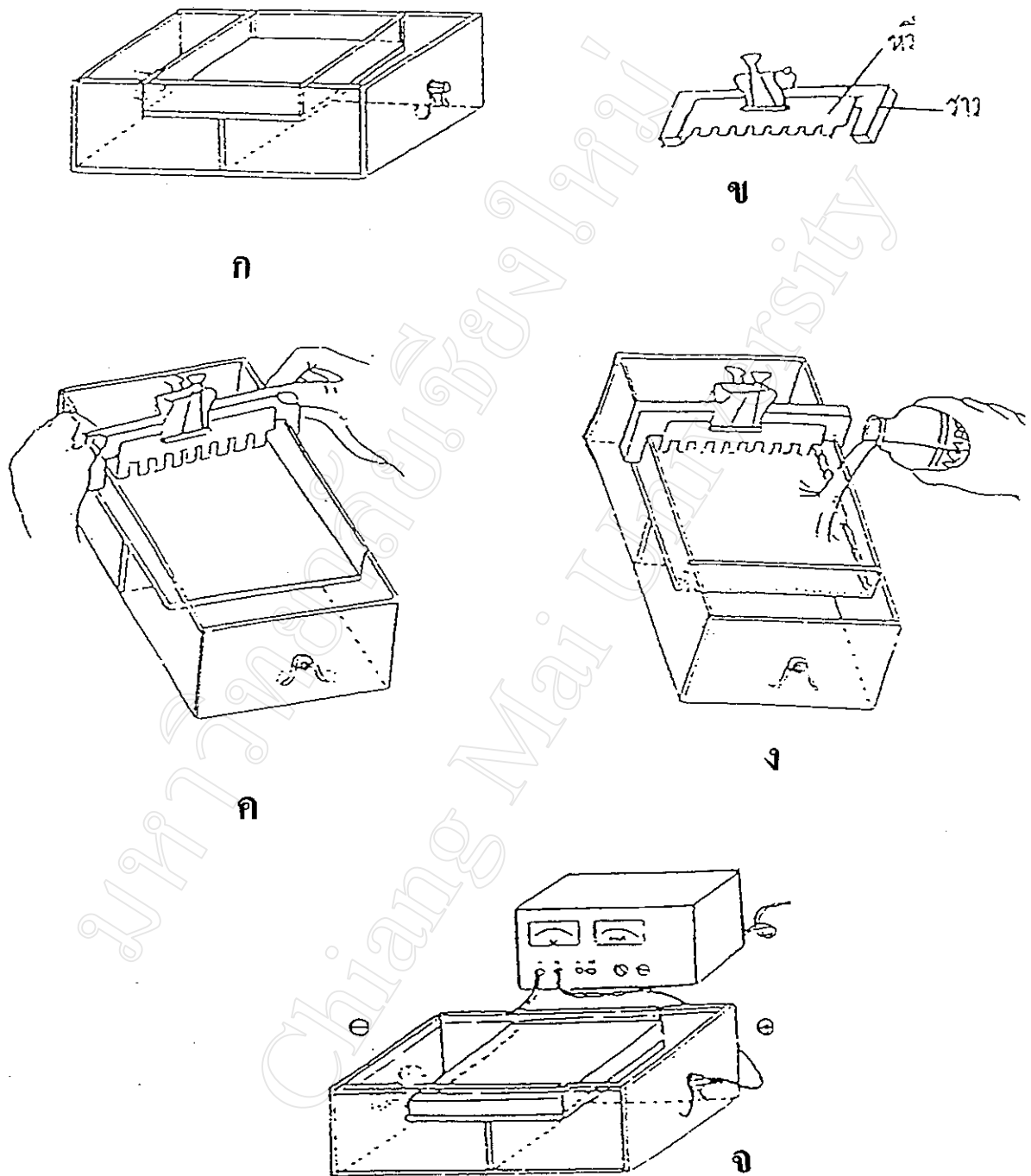
4. อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) (Maniatis *et al.*, 1982; อภัสสร, 2537)

4.1 การเตรียมอะกาโรสเจล

อะกาโรสเจลที่ใช้ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสมีความเข้มข้นประมาณ 0.5–1.8 % โดยเตรียมอะกาโรสเจลได้โดยเติมผงอะกาโรสลงในบัฟเฟอร์ นำไปต้มจนเดือดแล้วตั้งให้สารละลายอะกาโรสเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 °C จึงนำไปเทในเจลแชนเบอร์ (gel chamber) ที่ทำการติดพลาสติกเทปป้องกันเจลไหลออก (รูป13) นำ comb ลงในเจลให้ปลาย comb สูงจากพื้นเจลแชนเบอร์ประมาณ 2 mm (รูป13ค) ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว จึงค่อยๆ ดึง comb และแถบพลาสติกเทปออกจากเจลแชนเบอร์ จะได้อะกาโรสที่มีหลุมสำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอตามต้องการ (รูป13จ) เทบัฟเฟอร์ลงไปให้ท่วมเจลสูงประมาณ 1–3 mm

4.2 การหยอดสารละลายตัวอย่างดีเอ็นเอ

ก่อนที่หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอลงในหลุมบนเจลต้องผสมตัวอย่างดีเอ็นเอกับสียติดตาม (tracking dye) ประกอบด้วยสารที่มีความหนืดซึ่งอาจเป็นกลีเซอรอล, ซูโครส (sucrose) หรือ ficol และ 0.25 % ของสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและมีประจุลบเนื่องจากดีเอ็นเอมีประจุลบและพุ่งได้ง่ายในบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยทั่วไปจะมีสียติดตามก็คือ bromophenol blue หรือ bromophenol green เพื่อให้ง่ายต่อการสังเกตหรือติดตามภายหลังการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยมากจะเตรียมสียติดตามในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นประมาณ 6 เท่า เมื่อต้องการใช้จะผสมกับสารตัวอย่างดีเอ็นเอในอัตราส่วน 1 : 5 แล้วจึงนำไปหยอดลงในหลุมบนอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้โดยไม่โครปีเปด



รูป 13 แสดงส่วนประกอบต่างๆ ของ gel chamber และวิธีการเตรียมอะกาโรสเจลเพื่อใช้ทำ อิเล็กโทรโฟรีซิส

ก. gel chamber

ข. comb

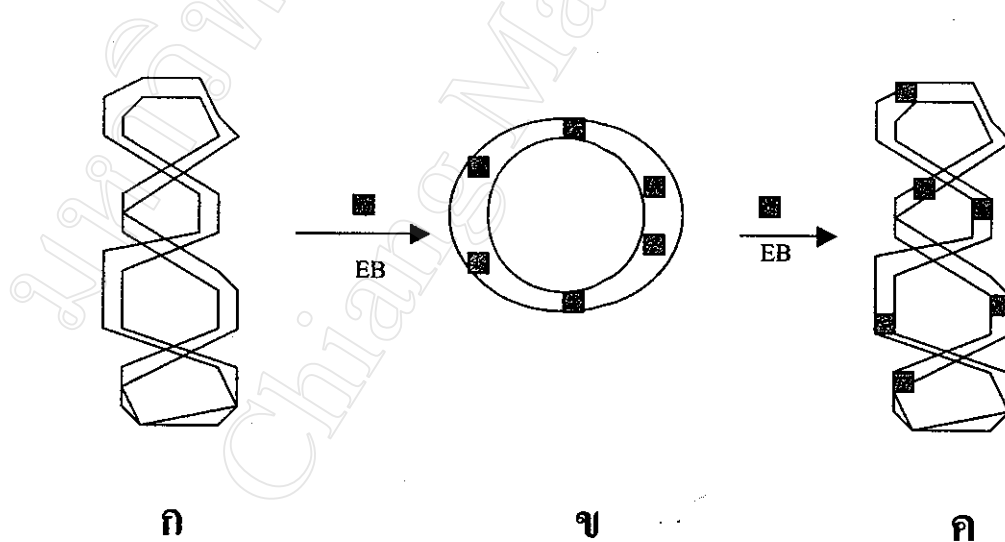
ค. การวาง comb

ง. การเทอะกาโรสเจลลงใน gel chamber

จ. ชุดอุปกรณ์การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

4.3 การย้อมดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล

การตรวจหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอจากอิเล็กโทรโฟรีซิส จะทำโดยการย้อมอะกาโรสเจลด้วย ethidium bromide โมเลกุลของ ethidium bromide จะเข้าไปจับกับเบสคู่สมของดีเอ็นเอ เกิดยวคู์โดยการ intercalate ดังแสดงในรูป 14 จะเห็นว่า supercoiled ของพลาสมิดรูป 14 ก เมื่อเติม ethidium bromide ลงไปจะเกิดการแทรกตัวของ ethidium bromide เข้าไปจับกับเบสคู่สมของดีเอ็นเอซึ่งในช่วงนี้จะทำให้โครงสร้างพลาสมิดอยู่ในรูปอีสระ (relax form) ดังรูป 14 ข เมื่อโมเลกุล ethidium bromide เข้าจับดีเอ็นเอได้จนถึงขีดจำกัดแล้ว จะทำให้โครงสร้างของพลาสมิดกลับมาอยู่ในรูป supercoiled ได้อีกดังรูป 14 ค แต่จะมีทิศทางการหมุนในทิศทางตรงกันข้ามกับรูป 14 ก การติดตามการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอในขณะที่ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสสามารถทำได้โดยการเติม ethidium bromide ความเข้มข้น $0.5 \mu\text{g/ml}$ ลงในบัฟเฟอร์และอะกาโรสและติดตามการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอโดยการมองภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ซึ่งโดยทั่วไปจะต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอไม่ต่ำกว่า 50 ng ต่อหนึ่งแถบจึงจะเห็นแถบวงแสงสีส้มภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตได้อย่างชัดเจนด้วยตาเปล่าหลังจากการย้อมด้วย ethidium bromide ในกรณีที่มีปริมาณดีเอ็นเอมากเกินไป (มากกว่า $30 \mu\text{g}$) แถบดีเอ็นเอที่แยกได้จะไม่คมชัดและจะเกิดเทลลิง (tailing) ขึ้นได้



รูป 14 แสดงการ intercalate ระหว่าง ethidium bromide กับเบสคู่สมของดีเอ็นเอ

- ก. พลาสมิดที่อยู่ในรูป supercoiled ข. พลาสมิดที่อยู่ในรูป relax form
ค. พลาสมิดที่อยู่ในรูป supercoiled หลังย้อม ethidium bromide

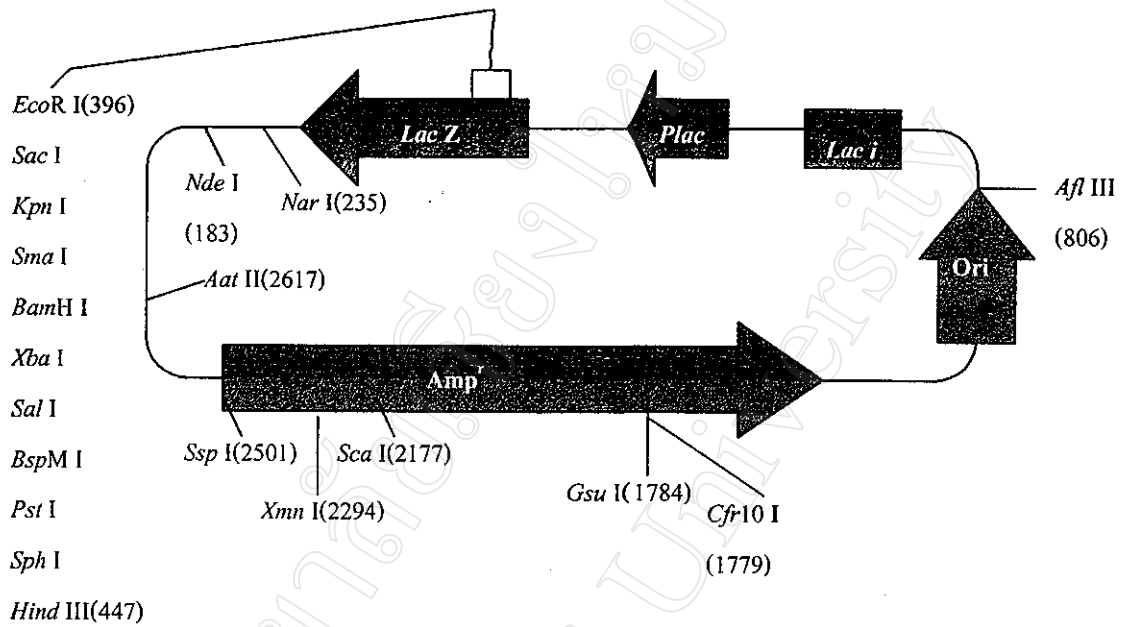
4.4 การถ่ายภาพดีเอ็นเอ

เนื่องจาก ethidium bromide สามารถเข้าจับกับเบสคู่สมในดีเอ็นเอได้แต่เป็นการจับแบบไม่ถาวร ดังนั้นเมื่อต้องทำการเก็บผลการทดลองที่ผ่านการย้อมสีด้วยวิธีนี้จึงต้องถ่ายภาพเก็บไว้ในการถ่ายภาพอาจใช้กล้องธรรมดาหรือกล้องโพลาลอยด์ ส่วนฟิล์มที่ใช้กับกล้องธรรมดานั้นควรจะเป็นฟิล์มที่มีความไวแสงสูง เช่น ฟิล์ม Tri-X, Kodak การถ่ายภาพมักทำโดยใช้ filter สีส้มหรือแดงเพื่อให้ภาพดีเอ็นเอชัดเจนมากขึ้น

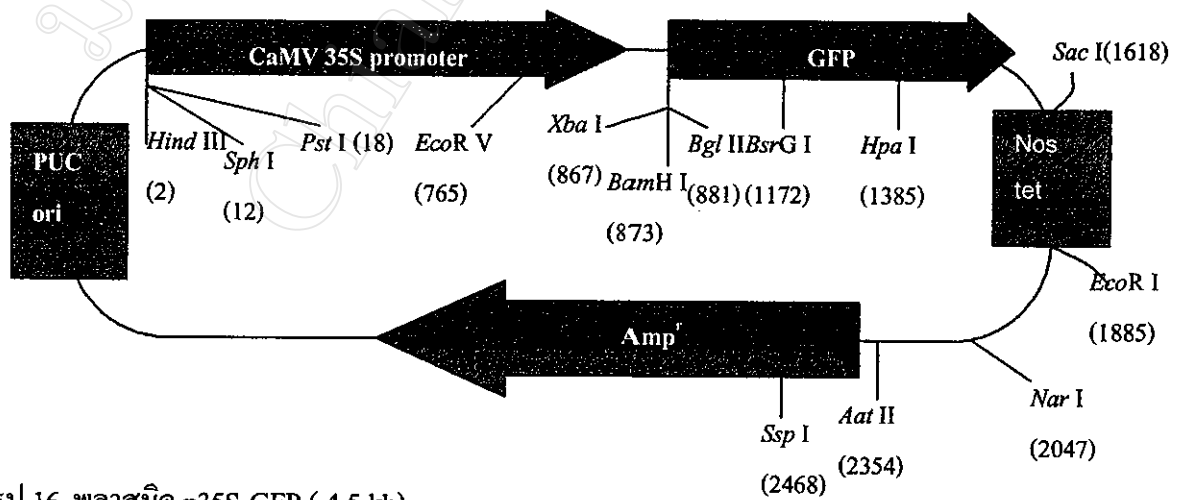
5. พลาสมิดที่ใช้ในวิทยานิพนธ์

5.1 pUC19 คือ พาหะ (vector) ที่มีขนาด 2.7 kb บรรจุด้วย multicloning site ที่มีจุดตัดของเอนไซม์ 14 จุด ซึ่ง multicloning site นี้อยู่ในส่วนของ *lacZ* α -fragment การแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการลงในตำแหน่ง multicloning site รูป 15 จะทำให้หยุดการทำงานของยีนที่สร้าง β -galactosidase ที่เป็นเอนไซม์สำคัญที่จะทำให้เซลล์เป็นสีน้ำเงิน เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มีส่วนผสมของ X-gal และ IPTG นอกเหนือจากนี้พลาสมิดชนิดนี้มียีน *Amp^r* ของ *E. coli* เพื่อที่สามารถให้แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดนี้เจริญอยู่ในอาหารที่มี ampicillin และ *Ori* elements ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นในการ replication ทำให้แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดชนิดนี้เข้าไปสามารถเพิ่มปริมาณของพลาสมิดดังกล่าวได้ง่ายเมื่อเข้าไปอยู่ในเซลล์แบคทีเรีย

5.2 p35S-GFP คือ พาหะที่มีขนาด 4.5 kb บรรจุด้วยยีน *GFP*, *CaMV35S* promoter, *NOS*, *AmpR* และ *Ori* ของ pUC19 ดังรูป 16 ซึ่งยีน *GFP* จะแสดงออกเมื่อมี Promoter *CaMV35S* ซึ่งยีน *GFP* จะแสดงออกเฉพาะในเซลล์พืชเท่านั้น จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการส่งถ่ายพลาสมิดชนิดนี้เข้าสู่พืช เพราะสามารถตรวจสอบเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดชนิดนี้โดยการเรืองแสงของโปรตีน GFP ภายใต้แสง fluorescent และจากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มี ampicillin ด้วย ส่วน *Nos* terminal gene ทำหน้าที่ในการเติม Poly A และหยุดการแสดงออก ในกรณีที่ส่งถ่ายพลาสมิดชนิดนี้เข้าไปในแบคทีเรียจะสามารถตรวจสอบได้จากเซลล์ที่เติบโตบนอาหารแข็งที่มี ampicillin

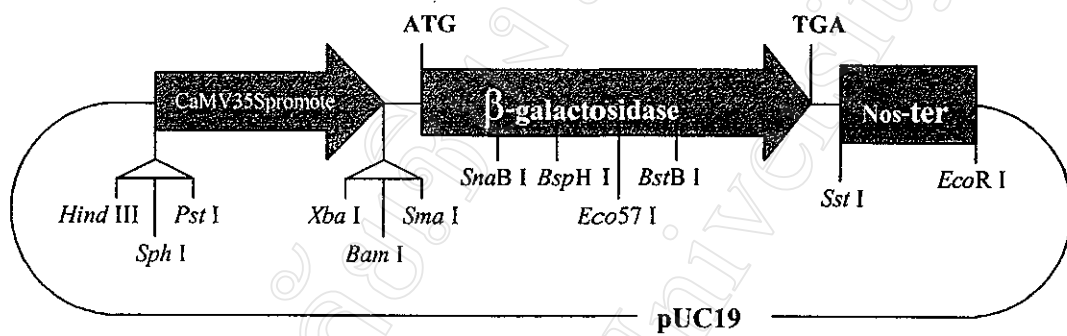


รูป 15 พลาสมิด pUC19 (2.7 kb)



รูป 16 พลาสมิด p35S-GFP (4.5 kb)

3. **pBI221** คือ พาหะที่มีขนาด 5.7 kb บรรจุด้วยยีน *CaMV35S* promoter, β -glucuronidase (*GUS*), *Nos* terminal และรวมเข้ากับพลาสมิด pUC19 ดังรูป15 ทำให้ pBI221 (ดังรูป17)เหมาะสมในการส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืช และแบคทีเรียจากความสามารถของพลาสมิด pUC19



รูป 17 พลาสมิด pBI221 (5.7 kb)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายวีระชัย ศิริอรุณศิริ
วัน เดือน ปีเกิด	20 ธันวาคม 2518
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขา พืชศาสตร์ (พืชผัก) คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เมื่อปีการศึกษา 2540